

## 2 種類のシスプラチン (CDDP) 抵抗性ヒト膀胱癌細胞株の樹立と RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析

藤田医科大学大学院 医学研究科  
腎泌尿器外科 (指導教授: 白木良一)

飴 本 剛之介

### 1. 緒 言

膀胱癌発生数は、全世界で毎年 1200 万例を超え、9 番目に多い癌と推定されている。わが国の 2008 年における膀胱癌の年齢調整罹患率 (/10 万人/年・基準人口は昭和 60 年のモデル人口) は、7.2 であり、男女別にみると男性 12.8/女性 2.8 と男性において約 4 倍高頻度に発生している。2012 年の集計にて、年齢調整死亡率 (/10 万人/年・基準人口は昭和 60 年のモデル人口) は、男女合計で 2.1 (男性 3.6, 女性 1.0) である。年齢調整罹患率および年齢調整死亡率は過去 10 年間ほぼ不変である。年齢分布としては比較的高年齢層に発症することが知られている。

膀胱癌は、膀胱の尿路上皮 (移行上皮) 粘膜より発生する悪性腫瘍で、病理組織学的には約 90% 以上は尿路上皮癌である。その他、扁平上皮癌や腺癌、小細胞癌が数%に認められる。膀胱癌の臨床的特徴として、空間的、時間的多発性が挙げられる。すなわち、診断時すでに膀胱内に多発する場合や、内視鏡による可視病変の完全切除後に膀胱内再発を認める頻度も高い。また、膀胱と同様に尿路上皮粘膜を有する腎盂・尿管・尿道といった他の部位に病変を合併することも多く、診断時には尿路全体をスクリーニングする必要がある。膀胱癌の主なリスク因子は喫煙、職業性発癌物質や環境性発癌物質への暴露、膀胱内の慢性炎症、特定の抗癌剤や放射線治療に伴う二次発癌等の医学的要因、遺伝的感受性等が挙げられている。

喫煙は、最も重要な膀胱癌のリスク因子である。喫煙者は、非喫煙者に比較して 2~5 倍膀胱癌の発症リスクを高めるとされる。喫煙の膀胱癌に関しては、煙草関連の発癌物質として 60 種類以上の物質が指摘されている。このうち amino-biphenyl などを含む arylamines や活性酸素が膀胱癌の発生に重要と考えられている。また、喫煙者に発生する膀胱癌は、非喫煙者の場合に比較して、より腫瘍径が大きく、多発する傾向にあり、組織学的により高異型度の傾向があることが指摘されている。日本泌尿器科学会の膀胱癌登

録データベースの解析では、喫煙者の膀胱癌の発症は、非喫煙者より約 5~6 年早いことが判明した。

膀胱癌は、特定の産業従事者が取り扱う化学物質が発癌に強く関与することが確認された最初の固形癌である。19 世紀、ドイツの Rehn により、化学染料中に存在する芳香族アミン類への暴露を原因とする職業性膀胱癌の存在が初めて報告された。現在本邦においても、1972 年に施行された労働安全衛生法により、4 種類の芳香族アミン類 (benzidine, 2-naphtylamine, 4-aminobiphenyl, 4-nitrobiphenyl) の製造、使用、輸出が禁止されている。これら 4 物質のいずれも膀胱発癌の原因となりうることが知られているが、特に benzidine と 2-naphtylamine の発癌性が強いとされる。これら発癌性アミン類により生じる職業性膀胱癌の臨床病理学的特徴として、①若年発症の傾向がある。② high grade, high stage の筋層浸潤性癌が多い。③上部尿路再発のリスクが高い等が指摘されている。

膀胱発癌に影響しうる他の医学的要因としては、尿路の慢性炎症が知られている。欧米や本邦では扁平上皮癌は比較的稀であるが、エジプトではその頻度が高い。この原因としてエジプト、ナイル川流域の風土病であるビルハルツ住血吸虫症が関与しており、住血吸虫が膀胱壁内に産卵することにより慢性炎症が引き起こされ、尿路上皮の扁平上皮化が生じ扁平上皮癌の発生母地となるとされている。同様の病理学的変化は膀胱結石や神経因性膀胱に合併した複雑性尿路感染症の症例でも認められる。その他、医薬品としてはシクロフォスファミドやフェナセチンの連用、骨盤臓器に対する放射線治療の際に生じる膀胱への被曝、ヒ素への曝露等が尿路上皮癌の発生要因となりうる。

膀胱癌が発見される契機となる主な臨床症状は、血尿 (無症候性肉眼的血尿、顕微鏡的血尿)、膀胱刺激症状 (頻尿、排尿時痛、残尿感等) である。特に無症候性血尿は、最も頻度の高い症状であり、過去の報告では同症状を主訴とする患者の 13~28% が膀胱癌と診断されている。一方で、顕微鏡的血尿の背景疾患とし

ての膀胱癌の頻度は高いものではなく、0.4～6.5%と報告されている。<sup>21, 22</sup>しかし、膀胱癌は高齢者に好発する悪性腫瘍であり、50歳以上で顕微鏡的血尿症例における膀胱癌の頻度は、若年の症例群に比較して有意に高いとする報告もある。<sup>23</sup>また膀胱刺激症状は、膀胱癌症例の約3分の1で認められ、膀胱壁内筋層に進展する筋層浸潤癌や、高異型度癌細胞が粘膜表層に広がる上皮内癌（CIS）に伴うことが多い。したがって治療に難渋する膀胱炎様症状を有する患者では、膀胱癌を鑑別診断にあげる必要がある。<sup>24</sup>膀胱癌の罹患率がそれほど高くないことから、一般検診における膀胱癌スクリーニングの有用性については否定的見解が多い。前述した喫煙歴のある高齢者や、職業性発癌物質曝露既往歴を有するなど、いわゆる高リスク群を対象を限定した場合、検尿及び尿細胞診の年一回程度の施行が最も効率が良いスクリーニング法と考えられる。<sup>25-27</sup>

近年、尿細胞診以外で注目される膀胱癌診断法として、UroVysionがある。UroVysionは膀胱癌で変異が認められることが多い、染色体／遺伝子異常である、3番、7番、17番染色体 aneuploid および9番染色体短腕21領域の detection を Multi-color fluorescence in situ hybridization（FISH）assay で検出することで膀胱癌を診断する。<sup>28</sup>

また、膀胱癌と遺伝子異常で最も関連するものとして p53 が挙げられる。p53 蛋白は細胞核内に存在し、種々の癌において変異、欠失が報告されている癌抑制遺伝子であり、膀胱癌の発生や進展には p53 遺伝子の関与が指摘されている。特に、p53 の変異は high-grade, high-stage の腫瘍に多く認められるとの報告が多く、進行がんや CIS との関与も指摘されている。<sup>30</sup>また、病理学的な因子である異形度、深達度、脈管侵襲にも p53 の変異が相関すると報告されている。<sup>31, 32</sup>本研究では、薬剤耐性に関する p53 の影響も含め、樹立細胞株を用いた遺伝子解析により、その影響を検討する。

膀胱癌に対する治療方針は正確な病期診断に基づき決定されるべきものであり、治療方針に多大な影響を与える病理診断、筋層浸潤の診断のために、経尿道的膀胱腫瘍切除術（TUR-BT）が必須である。約70%の初発膀胱癌は筋層非浸潤性膀胱癌であり、内視鏡的切除により根治手術を行う事が主流である。筋層非浸潤性膀胱癌のうち筋層浸潤性膀胱癌に進展する確率は約20～30%といわれている。また、筋層非浸潤性膀胱癌は50～80%の割合で再発を繰り返し、後に筋層浸潤性膀胱癌に移行するケースも少なくない。<sup>33</sup>正確な診断を得る目的で、筋層成分を含めた切除や、初回の TUR-BT での病理組織所見が T1 high grade 症例、あるいは切除切片に筋層成分が含まれていない場合に

2nd TUR が推奨されている。<sup>34, 35</sup>治療を兼ねた正確な TUR-BT による筋層非浸潤性・浸潤性の診断と、画像診断による限局性、有転移性の診断により、膀胱癌の治療方針が決定される。CIS（上皮内癌）、Ta（乳頭状非浸潤癌）（Stage0）、T1（粘膜上皮結合組織に浸潤）（Stage I）、を含めた筋層非浸潤性膀胱癌に対しては膀胱温存を治療コンセプトとするのが標準的である。また、いかに再発と進展を抑えるかが重要である。EAU ガイドラインでは筋層非浸潤性膀胱癌のスコア化を行い、腫瘍数、腫瘍サイズ、T 因子、併発 CIS、異型度と再発歴の6項目の各因子別に再発スコア、進展スコアが定められており、低・中・高リスク群にわけ、低リスク群は、①初発、②単発、③ Ta、④ G1（low grade）、⑤ 3 cm 以下、⑥ 併発 CIS 無し全て満たすことが条件となる。一方、高リスク群は、① T1、② G3（high grade）、③ 併発 CIS 有り、④ 多発・再発・3 cm を超える・TaG1G2 のいずれかを含むことが条件であり、これら以外のものが中リスク群に分類される。EAU の本リスク分類に基づく治療指針としては、低リスク群に対しては、TUR-BT＋術後の抗癌剤即時膀胱内単回注入が、中リスク群に対しては、抗癌剤即時膀胱内単回注入（＋複数回膀胱内注入）あるいは、BCG 膀胱内注入（＋維持注入を少なくとも1年）が、高リスク群に対しては、BCG 膀胱内注入（維持注入を少なくとも1～3年）あるいは膀胱全摘除術の選択がそれぞれのオプションとして推奨されている。症例に応じた術後膀胱内注入療法を追加治療として行うことで再発予防に関しては一定の治療成績をあげている。一方、BCG 抵抗性（BCG-refractory）36 症例（BCG 導入療法後3か月の時点で再発または腫瘍が残存し、6か月時点で消失しない）に対しては、膀胱全摘除術が推奨される。温存にこだわり、膀胱全摘のタイミングを逸しないことも重要である。

転移を認めない膀胱に限局した筋層浸潤性膀胱癌（Stage II、Stage III）に対しては制癌性を最優先とした根治的膀胱全摘除術＋骨盤内リンパ節郭清術＋尿路変更術が標準的な選択である。微小転移の抑制の治療と原発巣の down staging を期待し neoadjuvant 化学療法は意義がある。膀胱全摘術後の病理学的診断に基づき、微小転移症例やハイリスク症例が判明した場合、adjuvant 療法として化学療法を行う。周術期に多剤併用化学療法を含む集学的治療によって治療成績の向上が試みられている。一方、患者の高齢化やニーズの多様性に伴い、選択肢の1つとして QOL の維持を考慮した化学療法と放射線療法を併用した膀胱温存療法も試みられている。<sup>37</sup>

有転移性膀胱癌（Stage IV）の治療は生存期間の延長を目的とした全身化学療法が中心となる。適応を選ぶ



ことにより、外科的治療が予後改善のみならず症状の緩和に有効である症例も存在する。標準化学療法は CDDP を基盤とした GC 療法や M-VAC 療法である。<sup>38</sup> 1985 年に Sternberg らによって転移性または再発性膀胱癌に対する化学療法として M-VAC 療法 (methotrexate, vinblastine, doxorubicin, CDDP) が報告された。<sup>39</sup> その後 2000 年の von der Maase らのランダム化比較試験で初めて gemcitabine と CDDP の 2 剤併用療法 (GC 療法) が進行性膀胱癌に対して M-VAC 療法と同等の効果を示し、有害事象が少ないことが示され、<sup>40</sup> 現在では 1 次治療として GC 療法が広く普及している。その後 CDDP, Taxan 系抗癌剤 (paclitaxel, docetaxel, または larotaxel), gemcitabine, ifosfamide などを用いた多剤併用化学療法の 1st line または 2nd line 治療としての臨床試験が行われたが、現時点までに大規模ランダム化比較試験で明らかに M-VAC または GC の治療成績を凌駕する治療法は確立されていない。近年ではベムプロリズマブ等の免疫チェックポイント阻害薬が新規導入されつつあるが、<sup>41</sup> 5 年生存率については未だ 10% 未満と予後不良で、治療効果も一時的であることから、治療経過中に薬剤抵抗性を獲得すると推測されている。<sup>42, 43</sup>

CDDP の制がん剤としての開発の歴史は、物理学者の Rosenberg らが 1965 年に大腸菌への電場の効果を検証する際、偶然プラチナ電極の分解産物が大腸菌の増殖を抑制し、フィラメントを形成させることを発見した。その後 1969 年には、Rosenberg らより白金化合物の大腸菌に対する細胞分裂阻止作用を応用して癌細胞の分裂抑制に対する研究が行われ、その結果ペイロン塩、つまりシスプラチンが動物腫瘍において比較的広い抗腫瘍スペクトルを有する化合物であることが判明した (図 1)。<sup>44</sup>

白金制がん剤である CDDP は、DNA と共有結合性付加物を形成することで、制がん活性を発揮すると考えられている。CDDP の抗腫瘍機序は、脱離基であるクロリド配位子が、水分子によって置換されることに始まる (図 2 A)。水分子置換された分子種は非常に反応性が高く、核内においては、主に DNA とさまざまな共有結合性付加物を形成する。その際、白金原子はプリン塩基、特にグアニン塩基の 7 位の窒素原子に優先的に結合し、隣接する 2 つのプリン塩基を架橋することが知られている (図 2 B)。DNA の共有結合性付加物の形成によって、転写因子やポリメラーゼの阻害、クロマチン破壊などが引き起こされ、最終的に細胞はアポトーシスへと導かれ、抗がん活性を発現すると考えられている。なお、DNA の複製阻害に関しては、この機構のみで CDDP の抗がん活性を説明することはできないと考えられている。また、細胞周期に対する影

響についても、例えば、低濃度の CDDP では G2 相で停止するものの細胞の一部は生存しており、その段階で生じるアポトーシスが抗がん活性の発現機構であるという考え方も提唱されている。<sup>46</sup>

一方、尿路上皮癌に対する CDDP を含む化学療法の治療成績は治療後生存期間 15 か月にとどまり、CDDP 抵抗例に対する治療法の開発が求められている。CDDP 抵抗性獲得のメカニズムとしては、(1) 細胞内に薬剤が移行しないようにする機構を強化する。(2) 細胞内に移行した薬剤を排出する機構を強化する。(3) 細胞内に入った薬物を無毒化する機構を増強する。(4) 核酸の修復システムを強化する等と推測されている。CDDP の膜輸送に関しては、リンパ腫細胞から単離された 200kDa の P-糖タンパク質の発現量と耐性の程度に相関が認められた。すなわち、この P-糖タンパク質が CDDP の排出ポンプの役割を果たすと推定されている。<sup>47</sup> また CDDP は重金属であり、ソフトな酸であるため、ソフトな塩基であるチオール化合物と強く反応し、細胞内に数 mmol/l と高濃度で存在するグルタチオンあるいはメタロチオネンが耐性に関与

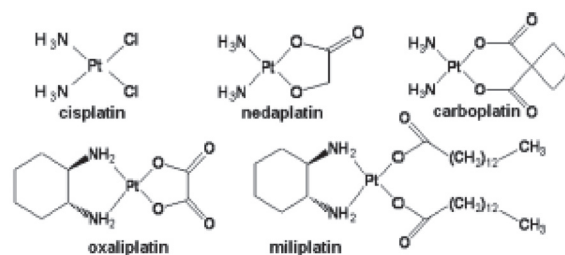


図 1 本邦で臨床使用が承認されている白金制がん剤の分子構造  
本邦において臨床使用が承認されているシスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチンおよびミリプラチン。世界的に広く臨床応用されている白金制がん剤は、シスプラチン、カルボプラチンおよびオキサリプラチンの 3 剤である。(参考文献 45)

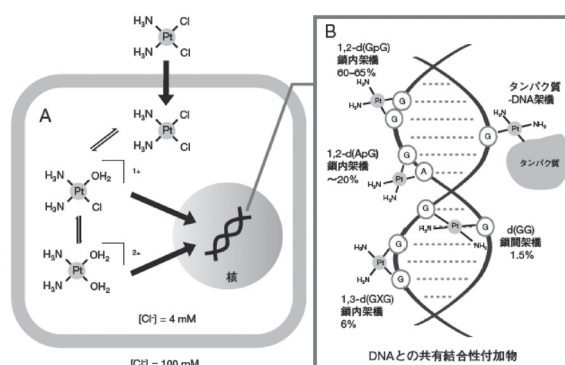


図 2 シスプラチンの作用機序

- A. 細胞質中の  $\text{Cl}^-$  濃度 (4 mM) は、血液中の  $\text{Cl}^-$  濃度 (100 mM) と比較して低いため、CDDP が細胞内に取り込まれると、クロリド配位子は水分子によって置換される。
- B. 水分子に置換された分子種はさまざまな共有結合性 DNA 付加物を精製する。

(参考文献 45)

するであろうと推定される。事実、獲得耐性を持つヒト子宮がん細胞でグルタチオン量が増加している例が認められている。<sup>48</sup>

CDDP 耐性に関する機序解明および耐性化の克服は、化学療法の成績を改善向上させるうえで現時点での最重要課題の一つである。膀胱癌の発生から、生物学的悪性度を獲得し治療抵抗性となり、浸潤・転移をしていく課程を分子機構の観点から明らかにすることは極めて重要である。この分子機構の全貌を明らかにするにあたり、次世代シーケンサー等を利用したオミックス研究が有効であることは論を待たない。<sup>49</sup> 実際に膀胱癌においてもがんゲノムアトラスプロジェクト (TCGA) の一環として 131 例の尿路上皮癌の統合解析を行い、包括的な分子特性が明らかとなった。<sup>50</sup> 筋層浸潤性膀胱癌や初期の非筋層浸潤性膀胱癌の包括的遺伝子発現パターンの解析から膀胱癌が分子的サブタイプ

に分類され、このサブタイプの識別が将来の予後判定や治療法の選択、さらに分子標的薬開発に資する可能性を示唆する研究が相次いで報告されている。<sup>53</sup>

我々は先行研究において、CDDP 耐性の獲得機序を解明する事を目的として、2 種類のヒト膀胱癌細胞株である T24 と RT4 を用いて CDDP 添加培地で培養することにより CDDP 耐性ヒト膀胱癌細胞株 T24CR と RT4CR を樹立した。さらに T24CR に対しては次世代シーケンサーを用いて RNA シークエンシング (RNA sequencing) による網羅的遺伝子解析を行った。

本研究では T24CR と RT4CR に対する RNA-seq により 2 つの異なる CDDP 耐性細胞株で発現変化する遺伝子群を探索し、異なる 2 群の癌細胞における詳細な遺伝子発現解析と機能解析を比較検討し、治療標的及び有効なバイオマーカーとなる候補遺伝子について検討した。

表 1 使用した膀胱癌細胞株と特徴

## 膀胱癌細胞株

Cell line	Age	Gender	Disease	p53
RT4	63	male	Transitional cell papilloma	wild type
T24	81	female	Transitional cell carcinoma (muscle invasive)	mutated

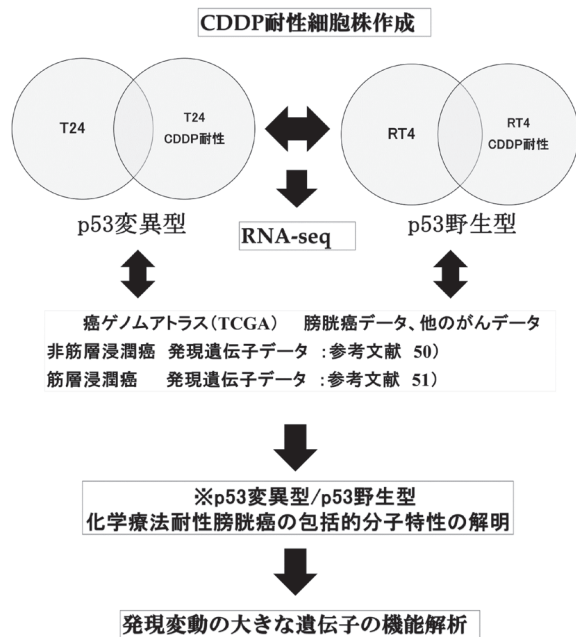


図 3 CDDP 耐性細胞株樹立および RNA-seq による網羅的遺伝子発現の解析  
T24 は p53 変異型 (p53 非依存性), RT4 は p53 野生型 (p53 依存性) 膀胱癌細胞株である。各々を CDDP と共培養し、暴露濃度を上昇させることにより CDDP 耐性株を樹立。生物学的特徴を元に、RNA 次世代シーケンス (RNA-seq) 解析を行った。

## 2. 対象と方法

### a. 尿路上皮細胞株と CDDP 耐性細胞株の樹立

先行研究同様、膀胱移行上皮癌に由来する p53 変異型の T24 細胞、乳頭状膀胱癌に由来する p53 野生型の RT4 細胞をそれぞれ American Type Culture Collection (ATCC) から入手し使用した (表 1)。先行研究で行った如く、それぞれの耐性細胞を樹立した。すなわち、T24 については CDDP を段階的に順次暴露濃度を変更し、計 4 か月間かけて T24 CDDP 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  耐性細胞株 (T24CR) を樹立した。一方、RT4 に関しては、CDDP を段階的に緩徐に暴露濃度を変更し、計 9 か月間かけて RT4 CDDP 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  耐性細胞株 (RT4CR) を樹立した (参考論文に掲載)。

### b. RT4 の RNA-seq 解析

生物学的特徴を解析し、RNA 次世代シーケンス (RNA-seq) による網羅的遺伝子発現解析を行った (図 3)。

RT4, RT4 CDDP1 日処理, RT4CR から精製した全 RNA1  $\mu\text{g}$  を抽出し、Bioanalyzer 2100 Eukaryote Total RNA nano kit (Agilent) を用いて RIN > 9.0 の全 RNA を使用した。NEBNext Poly (A) Magnetic Isolation Module および NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit (New England Biolab) を用いて mRNA-seq ライブラリーを調整した。調整したライブラリーのシーケンス解析は HiSeq1500 を用いて行った。3000-4000 万リードのシーケンスを CLC Genomics Workbench を用いてヒトゲノム (hg19) にマッピングし発現解析を行った。各遺伝子の発現量の単位は RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads) で示す。発現変動のあった遺伝子群を



さらに DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) により GO (Gene Ontology) 解析及び KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) パスウェイ解析を行った (T24 についての結果は先行研究論文に掲載)。

### c. quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

未処理の T24, RT4 に対して, CDDP1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で 1 日処理した T24 (T24CDDP24hr), RT4 (RT4CDDP24hr) と CDDP1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  耐性処理した T24 (T24CR), RT4 (RT4CR) から RNA を抽出した。RNeasy Mini キットを用いて, T24, T24CDDP24hr, T24CR, RT4, RT4CDDP24hr, RT4CR から全 RNA を抽出した。オリゴ (dT) プライマーおよび逆転写酵素をプロトコールに従い, 1  $\mu\text{g}$  の全 RNA から cDNA を生成した。qRT-PCR は, 7900 リアルタイム PCR システムを使用し, FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) を用いて行った。内在性コントロールには GAPDH を用い, 比較 CT (2-

$\Delta\Delta\text{CT}$ ) 法を用いて遺伝子発現の倍率を算出した。

### d. 統計学的解析

結果は平均値  $\pm$  標準誤差 (SEM) で表記した。各群の比較には Student t-test を用い, 統計学的解析を行った。

## 3. 結 果

### a. CDDP 処理前後の膀胱癌細胞株の形態

CDDP 処理前の T24 細胞の多くは, 紡錘型の形態を示した (図 4 a)。CDDP を 3 日毎に添加継続処理することにより, 紡錘型細胞は腫大した。

CDDP 処理約 4 週間後には, 細胞は腫大化し, 腫瘍増殖性を示した (図 4 b)。

一方 CDDP 処理前の RT4 細胞は, 敷石様の形態を示し細胞自体は表面平滑であった (図 5 a)。CDDP 処理約 1 週間目で細胞周囲に突起の形成が認められた (図 5 b)。

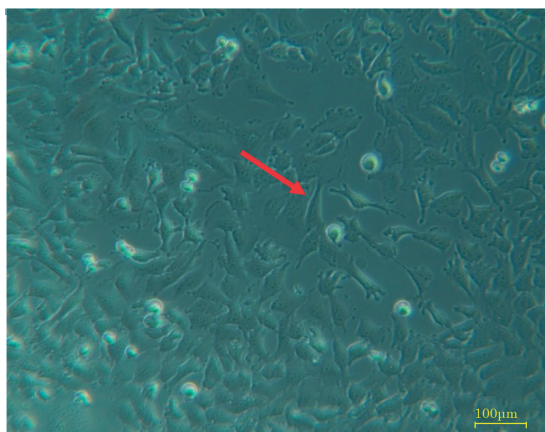


図 4 a T24 細胞 ( $\times 10$ )  
多くは紡錘形細胞の形態をとる (→)。



図 4 b T24CR ( $\times 20$ ) CDDP 処理 25 日目の T24 耐性細胞  
細胞は腫大化し, 腫瘍増殖性を示す (→)。

図 4 T24 と T24CR 培養細胞の顕微鏡所見

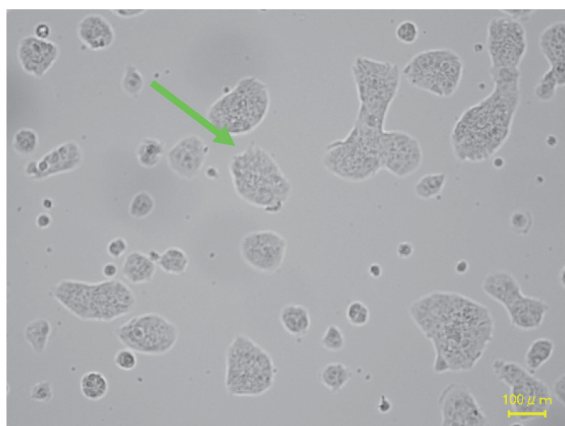


図 5 a RT4 細胞 ( $\times 10$ )  
敷石状の細胞で細胞周囲は平滑な特徴を持つ (→)。

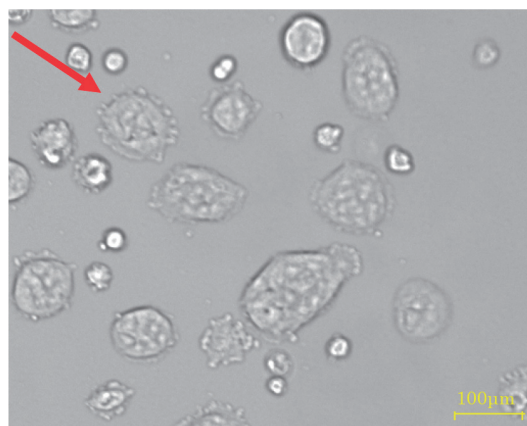


図 5 b RT4CR ( $\times 20$ )  
CDDP 処理約 1 週目で細胞周囲に突起を多く認めた (→)。

図 5 RT4 と RT4CR 培養細胞の顕微鏡所見

## b. 膀胱癌細胞株 T24 と T24CR に対する網羅的遺伝子解析 (RNA-seq)

CDDP 耐性細胞の性質をより詳細に解明し、さらに発現変動する遺伝子の機能解析を行うことにより、新たな治療の標的と有効なバイオマーカーの確立を目的として、遺伝子の網羅的発現解析 (RNA-seq) を行った。T24, T24CDDP24hr と T24CR で発現変動する網羅的遺伝子解析のパスウェイ解析の結果は先行研究に述べたが、T24CR では細胞接着や細胞の形態・分化・運動性に関わる遺伝子が含まれていることが判明した。また、一部アポトーシスの負の調節に関わる遺伝子群が濃縮されていた。

バイオマーカー候補の一つとして、T24CR で発現亢進が著明であった細胞接着に関わる L1CAM (L1 cell adhesion molecule) の Mapping を示す。L1CAM の発現変化では、正常膀胱上皮細胞である HBEC で 456 (RPKM 値)、T24 で 311, T24CDDP24hr で 497 に対

し、耐性獲得後の T24CR のみで 3158 と有意に発現亢進していた (図 6)。

## c. qRT-PCR

RNA-seq 解析の結果から T24, T24CDDP24hr に対し T24CR で発現亢進の著しい 3 種類の遺伝子 (C3, WNT5A, POSTN) を選択し、qRT-PCR を行った。各々のプライマーのリストを示す (表 2)。C3, WNT5A, POSTN 各々の RNA-seq における Mapping を示す (図 7)。C3 の発現 (RPKM 値) は、T24 で 34, シスプラチン処理 1 日 (T24CDDP24hr) で 32 に対し、耐性獲得後の T24CR のみで 2538 と有意に発現亢進していた。同様に WNT5A の発現は、T24 で 10, T24CDDP24hr で 6 に対し、耐性獲得後の T24CR で 253 と発現亢進していた。POSTN の発現も同様に、T24 で 5, T24CDDP24hr で 2 に対し、耐性獲得後の T24CR で 67 であった。

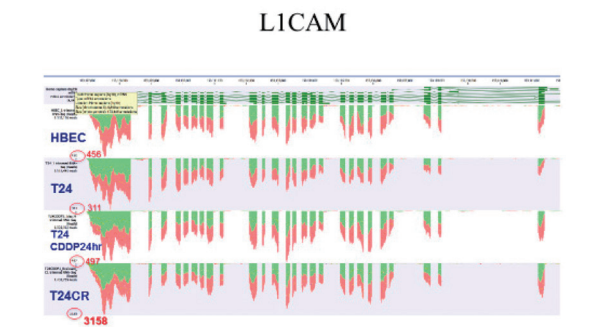


図 6 T24 および T24CR における L1CAM (L1 cell adhesion molecule) の Mapping  
CDDP 耐性獲得後の T24CR において、細胞接着分子に関わる L1CAM の有意な発現亢進を認めた。

表 2 T24CR で発現亢進を認めた遺伝子に対する qRT-PCR のプライマーリスト

Species	Direction	Gene	Sequence
Human	GAPDH	5'-forward-3'	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
		5'-reverse-3'	TGGTGAAGACGCCAGTCCA
Human	C3	5'-forward-3'	TGGCGAACAGAGGATTTCCC
		5'-reverse-3'	TCTGGTAGGGAGAGGTCACG
Human	WNT5A	5'-forward-3'	GCCAGTATCAATCCGACATCG
		5'-reverse-3'	TCACCGCGTATGTGAAGGC
Human	POSTN	5'-forward-3'	CTCATAGTCGTATCAGGGGTCG
		5'-reverse-3'	ACACAGTCGTTTTCTGTCCAC
Human	SOCS3	5'-forward-3'	CCAGTCTGGGACCAAGAACC
		5'-reverse-3'	TTGGCTTCTGTGCTTGTGC
Human	SPHK1	5'-forward-3'	GGAACTGGGCCACTGTGTCG
		5'-reverse-3'	CCCGCTGGATCCATAACCTC
Human	NFKBIA	5'-forward-3'	TGTGCTTCGAGTGACTGACC
		5'-reverse-3'	TCACCCACATCACTGAACG
Human	TBX3	5'-forward-3'	TCCCAAGTGATCACGCTACG
		5'-reverse-3'	GTGTCCCGGAAACCTTTTGC
Human	PRNP	5'-forward-3'	AGCTTCTCTCTCTCACA
		5'-reverse-3'	AAAGGGCTGCAGGTGGATAC

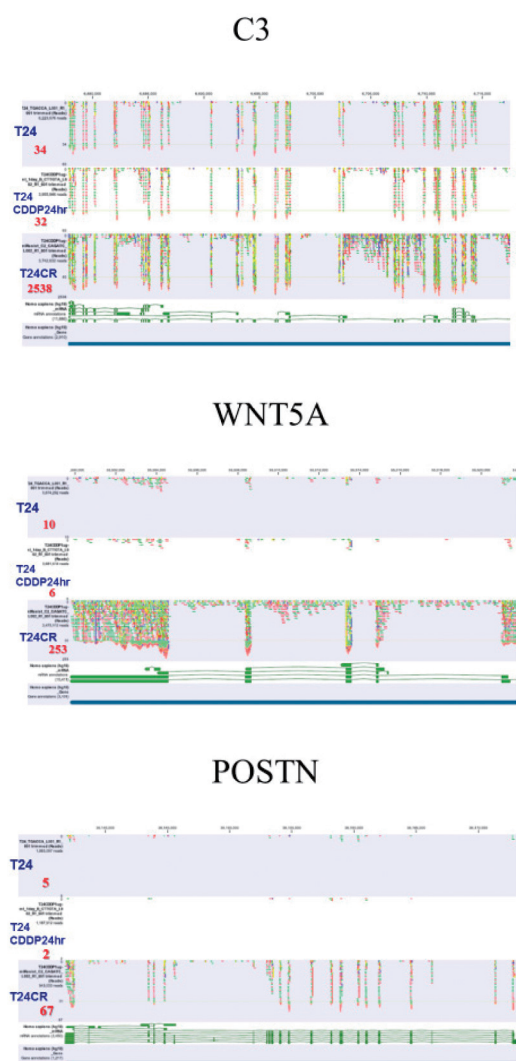


図 7 C3, WNT5A, POSTN 各々の RNA-seq における Mapping  
T24, T24CDDP24hr に対し T24CR で C3, WNT5A, POSTN が有意に発現亢進していた。



C3, WNT5A, POSTN に対して行った qRT-PCR では、それぞれの遺伝子で、RNA-seq と同様の結果を示し T24CR でのみ有意に発現亢進していた ( $p < 0.01$ ) (図 8)。

同様に RNAseq の結果からアポトーシス関連遺伝子で負の調節にかかわる遺伝子 (SOCS3, SPHK1, NFKBIA, TBX3, PRNP) の発現が T24 に対し T24CR で亢進していた。各々のプライマーのリストは同様に表 2 に示す。各遺伝子の RNA-seq における Mapping を示す (図 9)。SOCS3 の発現は、T24 で 152, T24CDDP24hr で 226 に対し、耐性獲得後の T24CR で 421 と発現亢進していた。SPHK1 の発現も、T24 で 490, T24CDDP24hr で 561 に対し、耐性獲得後の T24CR で 1091 と発現亢進していた。NFKBIA も同様に T24CR で 1700 と発現亢進していた。TBX3, PRNP の発現に関しても同様の結果であった。T24 に対し T24CDDP24hr, T24CR でアポトーシスの負の調節に関連していた遺伝子の qRT-PCR では、それぞれの遺伝子で、RNA-seq と同様の傾向を示した (図 10)。NFKBIA は、T24 に対し T24CR で有意に発現亢進していた (\*\* $p < 0.01$ )。

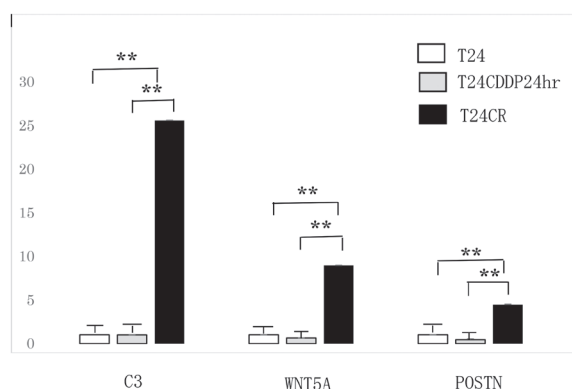


図 8 T24CR で発現亢進していた遺伝子の RT-PCR  
T24, T24CDDP24hr に対して T24CR で C3, WNT5A, POSTN が有意に発現亢進していた (\*\* $p < 0.01$ )。

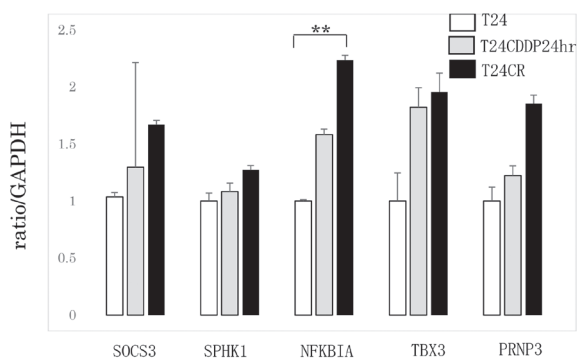
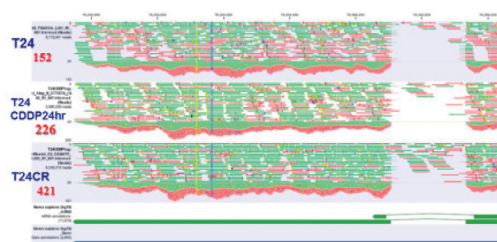
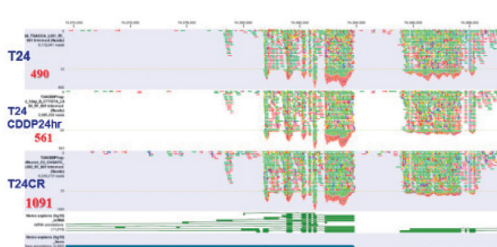


図 10 T24CR で発現亢進していたアポトーシス負の調節に関連する遺伝子の RT-PCR  
T24 に対して T24CR で、全ての遺伝子で発現亢進していたが、NFKBIA において、有意に発現亢進していた (\*\* $p < 0.01$ )。

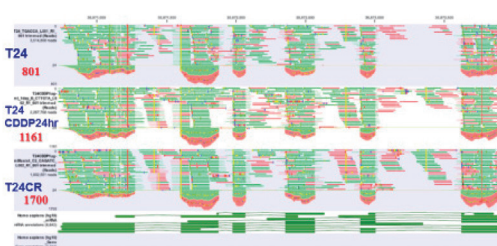
## SOCS3



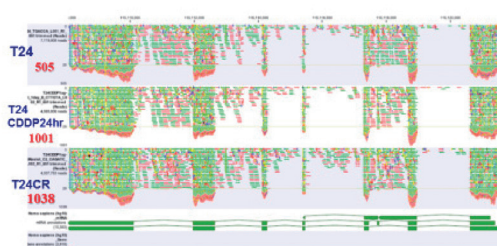
## SPHK1



## NFKBIA



## TBX3



## PRNP



図 9 SOCS3, SPHK1, NFKBIA, TBX3, PRNP 各々の RNA-seq における Mapping  
T-24 に対して T24CR で SOCS3, SPHK1, NFKBIA, TBX3, PRNP は各々発現亢進していた。

#### d. 膀胱癌細胞株 RT4 と RT4CR に対する網羅的遺伝子解析

T24 に対する RNA-seq 同様、未処理の RT4 細胞に対して、CDDP1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で1日処理した RT4 細胞 (RT4CDDP24hr), CDDP1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  耐性処理した RT4 細胞 (RT4CR) で発現変動する遺伝子を探索した。Fold Change  $> 2$ , FDR p-value  $< 0.05$  の条件で発現変動した遺伝子は、それぞれ 50, 3335 存在し、共通部分の遺伝子が 159 存在した (図 11)。

RT4 細胞に対し RT4CR で発現変動する遺伝子群の GO 及び KEGG パスウェイ解析を行ったところ、DNA

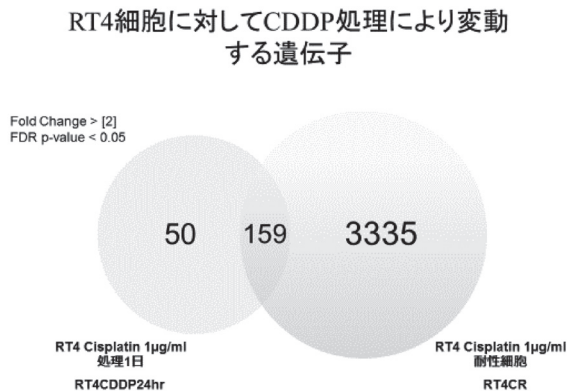


図11 RT4 と RT4CR に関する RNA-seq を用いた網羅的遺伝子解析結果  
未処理 RT4 細胞に対して CDDP 処理により変動する遺伝子数が変化 (Fold change  $> [2]$ , FDR p-value  $< 0.05$ )。

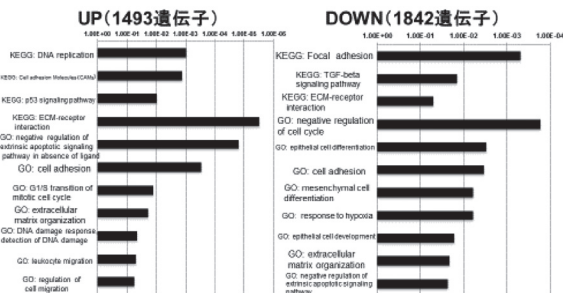


図12 RT4CR で発現変動する遺伝子群の GO (Gene Ontology) 及びパスウェイ解析 (3335 遺伝子)  
CDDP 耐性細胞では、DNA 複製, アポトーシス (p53 関連遺伝子を含む), 細胞接着分子 (EMT), 細胞遊走能, 細胞周期に関わる遺伝子群が濃縮されていた。

表 3 RT4 に対し RT4CR で p53 に関連した遺伝子の発現亢進していた遺伝子の qRT-PCR に用いられるプライマーリスト

Species	Direction	Gene	Sequence
Human		GAPDH	5'-forward-3' GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
			5'-reverse-3' TGGTGAAGACGCCAGTCCA
Human		CD82	5'-forward-3' AAAGCAGAACCCGCAGAGTC
			5'-reverse-3' GCAGGAAAGCAAAGTACAGCC
Human		CCNE2	5'-forward-3' CGGCCTATATTTGGGTTGGC
			5'-reverse-3' AAGGCAGCAGCAGTCAGTAT
Human		RRM2	5'-forward-3' CGGCGCGGGAGATTTAAAGG
			5'-reverse-3' CCAGGCATCAGTCCTCGTTT

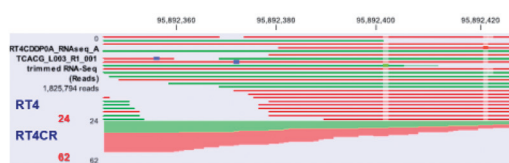
複製, p53 を含むアポトーシス関連遺伝子, EMT を含む細胞接着分子, 細胞遊走能, 細胞周期に関わる遺伝子群と T24CR と比較し独自の多様な遺伝子群が濃縮されていた (図 12)。

RNA-seq 解析の結果から RT4 に対し RT4CR で発現亢進の著しい遺伝子の中で p53 に関連した 3 種類の遺伝子 (CD82, CCNE2, RRM2) を選択し, qRT-PCR を行った。各々のプライマーのリストを示す (表 3)。CD82, CCNE2, RRM2 各々の RNA-seq における Mapping を示す (図 13)。p53 関連遺伝子の CD82 の発現 (RPKM 値) は, RT4 で 31 に対し, 耐性獲得後の RT4CR で 149 と発現亢進していた。CCNE2 の発現も, RT4 で 24 に対し, 耐性獲得後の RT4CR で 62 と発現亢進していた。RRM2 も同様に RT4 で 23 に対し, 耐性獲得後の RT4CR で 304 と発現亢進していた。p53 に関連していた遺伝子の qRT-PCR では, それぞれの遺伝子で, RNA-seq と同様の傾向を示した (図 14)。CD82 では RT4 に対して, RT4CR で有意に発現亢進していた (\*p  $< 0.05$ )。同様に RRM2 では RT4 に対して, RT4CR で有意に発現亢進していた (\*p  $< 0.01$ )。

#### CD82



#### CCNE2



#### RRM2



図13 RNA-seq で RT4 に対し RT4CR で発現亢進していた p53 関連遺伝子の Mapping  
RT4 に対して, RT4CR で CD82, CCNE2, RRM2 の発現亢進を認めた。



## e. T24CR と RT4CR に対する網羅的遺伝子解析

T24, RT4 に対して T24CR, RT4CR, で Fold Change  $> 2$ , FDR p-value  $< 0.05$  の条件で発現変動した遺伝子は、それぞれ 1748, 1192 存在し、共通に発現変動を 407 遺伝子に認めた (図 15)。

RT4CR と T24CR とに共通で発現変動する遺伝子群に対し GO・KEGG パスウェイ解析を行ったところ、アポトーシス、細胞遊走能、細胞接着分子 (EMT) に関わる遺伝子群が濃縮されていた (図 16)。

共通する遺伝子 407 に含まれる前述の WNT5A に関する Mapping を示す (図 17)。WNT5A の発現は、それぞれ元株に対し耐性細胞で発現亢進していた。

RT4 に対し RT4CR, T24 に対して T24CR の

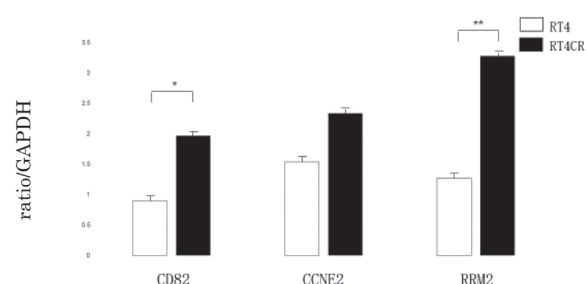


図14 RT4 に対し RT4CR で発現していた p53 関連遺伝子の RT-PCR RT4 に対して RT4CR で、全ての遺伝子で発現亢進していたが、特に CD82 と RRM2 が有意に発現亢進していた (\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ )。

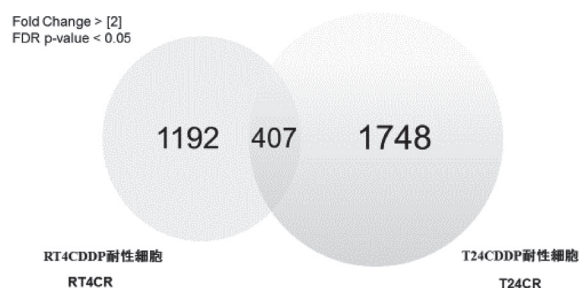


図15 T24CR と RT4CR で発現変動する RNA-seq を用いた網羅的遺伝子解析 (Fold change  $> [2]$ , FDR p-value  $< 0.05$ )。

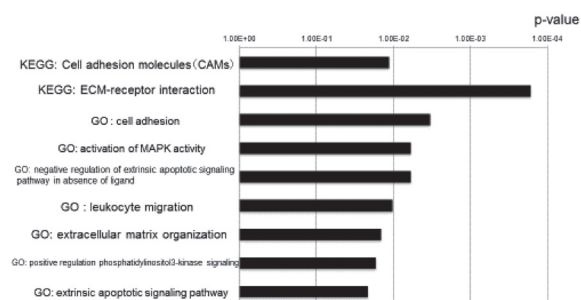


図16 RT4CR と T24CR に共通で発現変動する遺伝子群の GO・パスウェイ解析 (407 遺伝子)  
RT4CR と T24CR の共通遺伝子では、アポトーシス、細胞遊走能、細胞接着分子 (EMT) に関わる遺伝子が濃縮されていた。

WNT5A の qRT-PCR を示す (図 18)。

RT4 に対して RT4CR では、( $p < 0.05^*$ )、T24 に対し T24CR では ( $p < 0.01^{**}$ ) と有意に発現亢進していた。

## 4. 考 察

膀胱癌細胞における CDDP に対する分子応答は、アポトーシス、細胞周期、および p53 腫瘍抑制経路 (3 つの主要な生物学的経路) において役割を果たすことが知られている<sup>54, 55</sup>。アポトーシスは、内因性 (ミトコンドリア) および外因性 (細胞質) 経路を介して誘導することができる<sup>56</sup>。p53 腫瘍抑制因子は、細胞周期停止、DNA 修復、および細胞死における転写因子として重要な役割を果たす。p53 の喪失は、アポトーシスの発生率減少、細胞周期チェックポイントの不活性化、およびゲノム不安定性の減少をもたらす<sup>57</sup>。特に膀胱癌では p53 の変異は high-grade, high-stage の腫瘍に多く認められるとの報告が多く、CIS (上皮内癌) との

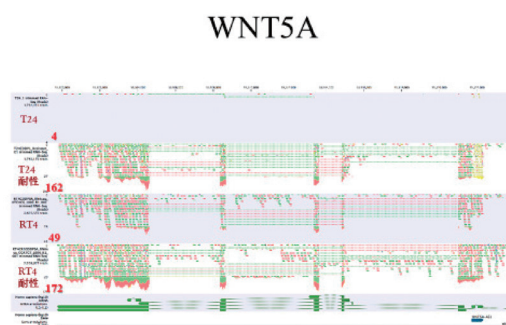


図17 RNA-seq の結果, T24, RT4 に対して T24CR, RT4CR で発現上昇していた WNT5A の Mapping  
T-24 に対して T24CR, RT4 に対して RT4CR で WNT5A は共に発現亢進。

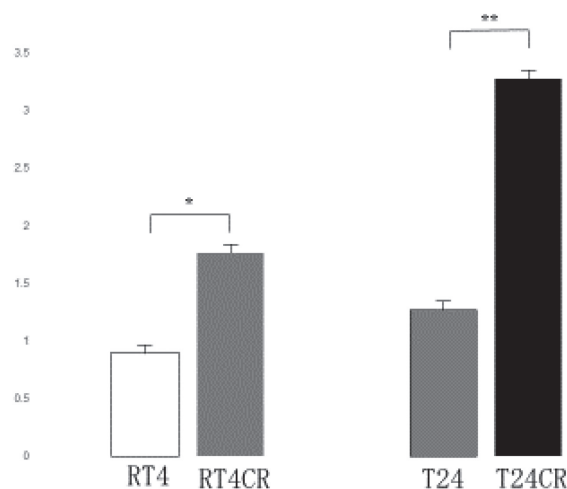


図18 RT4 に対し RT4CR, T24 に対して T24CR の WNT5A の qRT-PCR  
RT4 に対して RT4CR では、( $p < 0.05^*$ )、T24 に対し T24CR では ( $p < 0.01^{**}$ ) と有意に発現亢進。

関与も指摘されている<sup>58</sup>。

今回の RNA-seq による遺伝子発現解析と、この結果を検証する目的で行なった qRT-PCR の結果から、T24CR に関してはアポトーシス関連遺伝子、特に負の調節に関連する遺伝子群 (SOCS3, SPHK1, NFKBIA, TBX3, PRNP) の発現亢進と CDDP 耐性獲得の関連が示唆される結果となった。SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) は、炎症性アポトーシスを阻害することで知られている。SPHK1 (sphingosine kinase 1) は脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (SIP) を形成し、SIP は、炎症、抗アポトーシスおよび免疫プロセスにおいて重要な TNF- $\alpha$  シグナル伝達および NF- $\kappa$ -B 活性化経路において重要な役割を果たしている。NFKBIA (NFKB inhibitor alpha) は、REL 二量体と相互作用して、炎症応答に関与する NF- $\kappa$ -B/REL 複合体を阻害する。上記 3 つの遺伝子がアポトーシス関連負の調節に関連する遺伝子として CDDP 耐性に影響を及ぼし得ることは推察しやすい。一方 TBX3 (T-box 3), PRNP (prion protein) については発達過程でのアポトーシスに関連するものの CDDP 耐性との関連は今後検討を要すると考える。

膀胱癌細胞株 T24 は、元来変異型 p53 遺伝子を持つ筋層浸潤性の移行上皮癌で浸潤能が高く、アポトーシス誘導能が低い。さらに CDDP 耐性獲得にいたる過程でアポトーシス調節因子が協調し、負の調節に傾き、細胞死に至るシグナルをより強固に阻害するよう作用したと推測される。実際 Ito らの報告<sup>59</sup>ではアポトーシスを阻害する NF- $\kappa$ B の阻害薬投与により、CDDP 耐性膀胱癌の耐性獲得阻害効果と治療応用への可能性について報告している。我々の着目したアポトーシスにおける負の調節に関連したパスウェイは、CDDP 耐性獲得の解明のみならず、今後 NF- $\kappa$ B 阻害薬投与に類似した新たな治療標的の開発に貢献できる可能性がある。

RT4CR に関しては qRT-PCR の結果から、p53 関連遺伝子 (CD82, CCNE2, RRM2) の発現亢進と CDDP 耐性獲得の関連を示唆する結果を示した。これらのうち、CD82 (CD82 molecule) は膜糖タンパク質であり、CD82 の発現は p53 の発現と相関するとされる。CCNE2 (cyclin E2) はサイクリンファミリーに属し、サイクリンは、CDK2 の調節サブユニットとして複合体を形成し、CDK2 の調節サブユニットとして機能し、細胞周期 G1/S 移行において役割を果たす。RRM2 (ribonucleotide reductase regulatory subunit M2) はリボヌクレオチドレダクターゼのサブユニットをコードする。この還元酵素は、リボヌクレオチドからのデオキシリボヌクレオチドの形成を触媒している。

p53 シグナル伝達経路を経由する腫瘍細胞のアポト

ーシスに関する研究としては、神経芽細胞腫患者において p53 関連の CHAF1A, RRM2, MCM3 および MCM6 の発現が予後不良因子であるとの報告があり、本研究で示された RT4CR における RRM2 の発現亢進を支持すると考えられる<sup>60</sup>。p53 は mTORC1 を介して RRM1 と RRM2 を抑制するとされ、横紋筋肉腫細胞を用いた実験結果も、同様に我々の結果に相関している<sup>61</sup>。

一方、肺癌細胞におけるシスプラチン投与効果に関する研究では cell cycle 制御に関連した CCNE2, E2F1, CCNA ならびに CDK1 がシスプラチン投与により発現抑制を受けると報告されている。一方一旦発現抑制され細胞制御に向かうと考えられる各遺伝子が、本研究における RT4CR における CCNE2 の発現亢進の如くシスプラチン耐性を獲得する過程で逆に発現亢進すると考えられる。また乳癌における miR-26a の target としての CCNE2 に関する報告も、同様に我々の結果を支持すると考えられる。

一方 CD82 に関しては報告により見解が異なる。非小細胞肺癌 (NSCLC) において、は腫瘍転移抑制遺伝子として報告されている<sup>62</sup>一方で、急性骨髄性白血病モデルでは CD82 の阻害により抗腫瘍効果が増強すると報告されている。KAI1/CD82 は、細胞の運動性、接着、融合、および増殖の阻害を制御するメカニズムに関与するといわれているが、RT4CR における発現亢進の意義に関しては不明で今後の研究が待たれる<sup>63</sup>。

また異なる 2 つの CDDP 耐性細胞で WNT5A は共に遺伝子発現亢進を示した。

WNT5A (Wnt family member 5A) は膜貫通レセプター-frizzled-5 およびチロシンキナーゼオファンレセプター 2 のリガンドであり、胚発生中の発生経路を調節するのに必須の役割を果たす。一方発癌においても役割を果たす可能性がある<sup>64</sup>と報告されている。

WNT5A は、肺癌の細胞株で、シスプラチン存在下の A549/DDP 細胞 (肺癌 CDDP 耐性株) で細胞遊走能を促進することを示した。また、膀胱癌細胞では miR-129-5p は Gemcitabine 耐性を阻害し、アポトーシスを促進すると報告されている。WNT5A は miR-129-5p の直接標的遺伝子であることから、miR-129-5p の回復は Gemcitabine に対する細胞感受性を増加させることが知られている。さらに WNT5A のノックダウンは Gemcitabine 耐性を阻害することが明らかになった<sup>65</sup>。WNT5A は、2 つの膀胱癌細胞株 (T24, TCCSUP) における miR-374a の直接標的<sup>66</sup>で、WNT5A のダウンレギュレーションを介して膀胱癌細胞の転移能および侵襲性を無効にすると報告されている。T24CR, RT4CR に共通して WNT5A は発現亢進を示す事から、これらの報告に加えて薬剤治療の標的なら



びに薬剤耐性を示す有効なバイオマーカーになる可能性があり、継続して検討する必要がある。

今後 CDDP 以外にも Gemcitabine 等の膀胱癌治療に多く用いられる他の抗癌剤耐性膀胱癌細胞株を樹立し、本研究同様 RNA-seq を用いた網羅的遺伝子解析を応用し、新たなバイオマーカーの探索と新規治療法の開発への応用が期待される。今回解析した T24CR, RT4CR の 2 種類の CDDP 耐性膀胱癌細胞株に対する RNA-seq 解析を継続するとともに、WNT5A を中心とする発現変動の著しい遺伝子に着目し、今後は実際の臨床検体を用いた解析を進める。これにより薬剤耐性に関わる新たなバイオマーカーの探索と、新規標的治療法の開発が期待される。

## 5. 結 論

CDDP 耐性ヒト膀胱癌細胞株 T24CR と RT4CR を独自に樹立した。T24 に対し T24CR で発現変動の大きい遺伝子群 (C3, WNT5A, POSTN) において、RNA-seq 同様 qRT-PCR でも有意に発現上昇していた。RT4 に対し RT4CR で p53 関連遺伝子 (CD82, CCNE2, RRM2) において、RNA-seq の結果同様に qRT-PCR で発現亢進していた。

また、RNA-seq で T24 に対し T24CR, RT4 に対し RT4CR で発現亢進していた WNT5A は、それぞれ qRT-PCR においても耐性細胞で発現亢進していた。

これらは、CDDP 耐性におけるバイオマーカーとなりうるか今後臨床検体を用いて検討する必要があると考えられた。これらの遺伝子が、CDDP 耐性におけるバイオマーカーおよび耐性解除への治療ターゲットとしての可能性があり、今後更なる研究の発展が期待される。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました、藤田医科大学 腎泌尿器外科学講座 白木良一教授に深甚なる謝意を申し上げます。また、日頃より、多くのご指導とご校閲を賜りました同科 日下守教授に深謝申し上げます。日頃より、研究室を使用させていただきましたことを、総合医科学研究所 遺伝子発現機構の前田明教授に、深謝申し上げます。また、膀胱癌細胞株樹立から RNA-seq の解析にわたり、終始変わらぬ熱心な御指導を賜りました、総合医科学研究所 遺伝子発現機構の亀山俊樹先生に深謝いたします。また、本研究を行うに際し、CLC による網羅的解析細部にわたるご指導をいただきました、総合医科学研究所・分子遺伝学研究部門の稲垣秀人講師、難病治療学研究部門の常陸圭介先生、解剖学の尾身実先生に心より感謝いたします。そして、

本研究を進めるにあたり、終始変わらぬご協力、御指導をいただきました藤田医科大学 腎泌尿器外科学講座の教室員の皆様、関連施設の先生方に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 公益財団法人がん研究振興財団：がんの統計 '13. 部位別年齢階級別がん罹患率(2008)：CANCER STATISTICS IN JAPAN, 2013.
- 2) Lynch CF, Cohen MB, et al : Urinary system. *Cancer*. 1995 ; 75 : 316 - 329.
- 3) Hoglund M, et al : On the origin of syn-and metachronous urothelial carcinomas. *Eur. Urol*. 2007 ; 51 : 1185 - 1193.
- 4) Habuchi T, et al : Origin of multifocal carcinomas of the bladder and urinary tract : molecular analysis and clinical implications. *Int. J. Urol*. 2005 ; 12 : 709 - 716.
- 5) 日本泌尿器科学会：膀胱癌診療ガイドライン 2015 年版. 医学図書出版, 東京. 2015 ; pp.1 - 4.
- 6) Hoover R, Cole P, et al : Population trends in cigarette smoking and bladder cancer. *Am. J. Epidemiol*. 1971 ; 94 : 409 - 418.
- 7) Leppert JT, Shvarts O, Kawaoka K, et al : Prevention of bladder cancer : A review. *Eur. Urol*. 2006 ; 49 : 226 - 234.
- 8) Thompson IM, Peek M, Rodriguez FR, et al : The impact of cigarette smoking on stage, grade and number of recurrences of transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol*. 1987 ; 137 : 401 - 403.
- 9) Hinotsu S, Akaza H, Miki T, et al : The Japanese Urological Association. Bladder cancer develops 6 years earlier in current smokers : Analysis of bladder cancer registry data collected by the cancer registration committee of the Japanese Urological Association. *Int. J. Urol*. 2009 ; 16 : 64 - 69.
- 10) Shinka T, Sawada Y, Morimoto S, et al : Clinical study on urothelial tumors of dye workers in Wakayama city. *J. Urol*. 1991 ; 146 : 1504 - 1507.
- 11) Shinka T, Miyai M, Sawada Y, et al : Factors affecting the occurrence of urothelial tumors in dye workers exposed to aromatic amines. *Int. J. Urol*. 1995 ; 2 : 243 - 248.
- 12) Naito S, Tanaka K, Koga H, et al : Cancer occur-

- rence among dyestuff workers exposed to aromatic amines. A long term follow-up study. *Cancer*. 1995 ; 76 : 1445 – 1452.
- 13) Bedwan R, Renganathan E, Elkwahsky F, et al : Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt. *Br. J. Cancer*. 1998 ; 77 : 1186 – 1189.
  - 14) Scelo G, Brennan P, et al : The epidemiology of bladder and kidney cancer. *Nat. Clin Prac. Urol*. 2007 ; 4 : 205 – 217.
  - 15) Kantor AF, Hatge P, Hover RN, et al : Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am. J. Epidemiol*. 1984 ; 119 : 510 – 515.
  - 16) Travis LB, Curtis RE, Glimmerius B, et al : Bladder and Kidney cancer following cyclophosphamide therapy for Non-Hodgkin's lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst*. 1995 ; 87 : 524 – 530.
  - 17) Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, et al : Bladder tumors following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer. A case-control study. *Int. J. cancer*. 1995 ; 63 : 1 – 6.
  - 18) Ferreccio C, Yuan Y, Calle J, et al : Arsenic, tobacco smoke, and occupation : associations of multiple agents with lung and bladder cancer. *Epidemiology*. 2013 ; 24 : 898 – 905.
  - 19) Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, et al : Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer : a case-control study. *Int. J. Cancer*. 1995 ; 63 : 1 – 6.
  - 20) Kretschmer HL, et al : Hematuria : a clinical study based on 933 consecutive cases. *Surg. Gynecol. Obstet*. 1925 ; 40 : 683.
  - 21) Lee LW, Davis E Jr, et al : Gross urinary hemorrhage : a symptom, not a disease. *JAMA*. 1953 ; 153 : 782 – 784.
  - 22) Mohr DN, Offord KP, Owen RA, et al : Asymptomatic, not a disease. *JAMA*. 1953 ; 153 : 782 – 784.
  - 23) Golin AL, Howard RS, et al : Asymptomatic microscopic hematuria. *J. Urol*. 1980 ; 124 : 389 – 91.
  - 24) Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al : Urinary tract cancers found by homescreening with hematuria dipsticks in healthy men over 50 years of age. *Cancer*. 1989 ; 64 : 2361 – 2367.
  - 25) Britton JP, Dowell AC, Whelan P, et al : A community study of bladder cancer screening by the detection of occult urinary bleeding. *J. Urol*. 1992 ; 148 : 788 – 790.
  - 26) Brown FM, et al : Urine cytology. It is still the gold standard for screening? *Urol. Clin. North Am*. 2000 ; 27 : 25 – 37.
  - 27) Theriault GP, Tremblay CG, et al : Armstrong BG. Bladder cancer screening among primary aluminum production workers in Quebec. *J. Occup. Med*. 1990 ; 32 : 869 – 872.
  - 28) Chou R, Gore JL, Buckley D, et al : Urinary biomarkers for diagnosis of bladder cancer. *Ann Intern Med*. 2015 ; 163 : 922 – 931.
  - 29) Esrig D, Elmajian D, Groschen S, et al : Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N. Engl. J. Med*. 1994 ; 331 : 1259 – 1264.
  - 30) ハ十嶋仁, 桜井一成, 山田章彦, ほか : 膀胱上皮内癌の免疫組織学的検討. 癌の臨. 1996 ; 42 : 525 – 529.
  - 31) Bush C, Price P, Norton J, et al : Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labeling : Its potential clinical importance. *Br. J. Cancer*. 1991 ; 64 : 357 – 360.
  - 32) Mazerolles C, Rishhann P, Chopin D, et al : Usefulness of MIBI monoclonal antibody in assessing the proliferative index in human bladder carcinoma. *Histopathology*. 1994 ; 25 : 563 – 568.
  - 33) 鈴木康太郎 : 筋層非浸潤性膀胱癌の進展に関する臨床検討. 泌紀. 2012 ; 58 : 1 – 5.
  - 34) Schwaibold HE, Sivalingam S, May F, et al : The value of a second transurethral for T1 bladder cancer. *BJU Int*. 2006 : 1199 – 1201.
  - 35) 日本泌尿器科学会・日本病理学会・日本医学放射線学会編. 泌尿器科・病理・放射線科 腎盂・尿管・膀胱癌取り扱い規約(第1版), 金原出版, 東京. 2011.
  - 36) Nieder AM, Brausi M, Lamm D, et al : Management of stage T1 tumors of the bladder : International Consensus Panel. *Urology*. 2005 : 108 – 125.
  - 37) Azuma H, Inamoto T, Takahara K, et al : A great option for elderly patients with locally invasive bladder cancer, BOAI-CDDP-radiation (OMC regimen). *Int. J. Oncol*. 2013 ; 43 : 1087 – 1094.
  - 38) Advanced Bladder Cancer (ABC) meta-analysis collaboration : Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer : updated of a systemic review and meta-analysis of individual patient



- data. *Eur. Urol.* 2005 ; 48 : 202 – 206.
- 39) Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, et al : Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. *J. Urol.* 1985 ; 133 : 403 – 407.
- 40) Von der Maase H, Hansen SW, Robert JT, et al : Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer : results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J. Clin. Oncol.* 2000 ; 17 : 3068 – 3077.
- 41) 富田喜彦 : immuno-oncology drug によるがん薬物治療の新展開. 医事新報. 2018 ; 4901 : 53.
- 42) Tanaka N, Miyajima A, et al : Acquired platinum resistance enhances tumour angiogenesis through angiotensin II type 1 receptor in bladder cancer. *Br. J. Cancer.* 2011 ; 105 : 1331 – 1337.
- 43) Bamias A, et al : Prospective, open-label, randomized, phase III study of two dose-dense regimens MVAC versus gemcitabine/cisplatin in patients with inoperable, metastatic or relapsed urothelial cancer. *Ann. Oncol.* 2013 ; 24 : 1011 – 1017.
- 44) Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T, et al : Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965 ; 205 : 698 – 699.
- 45) Biomedical Research on Trace Elements 2015 ; Vol26 : 157 – 165.
- 46) Eastman, *Cancer Cells.* 1990 ; 2 : 275 – 280.
- 47) Kawai K, Kamitani N, Georges E, et al : *J. Biol. Chem.* 1990 ; 265 : 13137 – 13142.
- 48) Chu G, et al : Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 1994 ; 269 : 787 – 790.
- 49) Hajime Ohyanagi, et al : The Next generation Plant Science Revealed by the Omics Approaches and High-throughput DNA Sequencing Technologies. MSS 技報 2015 ; Vol23.
- 50) The Cancer Genome Atlas Research Network : Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature.* 2014 ; 507 : 315 – 322.
- 51) Choi W, Porten S, Kim S, et al : Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell.* 2014 ; 25 : 152 – 165.
- 52) A. Gordon Robertson, Jaegil Kim, Hikmat Al-Ahmadie, et al : Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. 2017. *Cell.* 2017 ; 171 : 1 – 17.
- 53) Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, et al : Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell.* 2016 ; 30 : 1 – 16.
- 54) Kontantakou EG, Voutsinas GE, Karkoulis PK, Aravantinos G, Margaritis LH, Stravopodis DJ, et al : Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-development and p53-independent responses. *Int. J. Oncol.* 2009 ; 35 : 401 – 416.
- 55) Boast P, Rottenberg S, Jonkers J, et al : How do real tumors become resistant to cisplatin?. *Cell Cycle.* 2008 ; 7 : 1353 – 1359.
- 56) Kaufmann SH, Hengartner MO, et al : Programmed cell death : alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 2001 ; 11 : 526 – 534.
- 57) Benchimol S, et al : p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001 ; 8 : 1049 – 1051.
- 58) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al : p53 mutations in human cancer. *Science.* 1991 ; 253 : 49 – 53.
- 59) Ito Y, Kikuchi E, Tanaka N, et al : Down-regulation of NF kappa B activation is an effective therapeutic modality in acquired platinum-resistant bladder cancer. *BMC Cancer.* 2015 ; 15 : 324.
- 60) Eveline Barbieri, Kathleen De Preter, Mario Capasso, et al : A p53 Drug Response Signature Identifies Prognostic Genes in High Risk Neuroblastoma. *PLOS One.* 2013 ; 1 – 10.
- 61) Zhengfu He, Xing Hu, Weijin Liu, et al : p53 suppresses ribonucleotide reductase via inhibiting mTORC1. *Oncotarget.* 2017 ; Vol8 : 41422 – 41431.
- 62) Prabhu VV, Devarai SN, et al : KAI1/CD82, Metastasis Suppressor Gene as a Therapeutic Target for Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2017 ; 36 : 269 – 275.

- 63) Nishioka C, Ikezoe T, Yokoyama A, et al : Blockade of CD82 by a monoclonal antibody potentiates anti-leukemia effects of AraC in vivo. *Cancer Med.* 2015 ; 4 : 1426–1431.
- 64) Yang J, Zhang K, Wu J, et al : Wnt5a Increases Properties of Lung Cancer Stem Cells and Resistance to Cisplatin through Activation of Wnt5a/PKC Signaling Pathway. *Stem Cells Int.* 2016 ; 1 : 1–16.
- 65) Cao J, Wang Q, Wu G, et al : miR-129-5p inhibits gemcitabine resistance and promotes cell apoptosis of bladder cancer cells by targeting Wnt5a. *Int. Urol. Nephrol.* 2018 ; 50 : 1811–1819.
- 66) Chen X, Jia C, JinX, et al : MicroRNA-374a Inhibits Aggressive Tumor Biological Behavior in Bladder Carcinoma by Suppressing Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018 ; 48 : 815–826.